



がん精巢抗原遺伝子のがん細胞と雄性生殖細胞における機能および発現機構の解析

著者	青木 七菜
号	16
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第371号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00126116

	あおき なな
氏名（本籍地）	青木 七菜
学 位 の 種 類	博士（生命科学）
学 位 記 番 号	生博第 371 号
学位授与年月日	平成 3 1 年 3 月 2 7 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 ， 専 攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生命機能科学専攻
論 文 題 目	がん精巣抗原遺伝子のがん細胞と雄性生殖細胞における機能および発現機構の解析
博士論文審査委員	（主査）教授 松居 靖久 教授 千葉 奈津子 教授 田村 宏治

論文内容の要旨

生殖細胞は、受精を経て、様々な体細胞と生殖細胞に分化し、一つの個体を作り出すことができる。また、がん細胞は、無限増殖を繰り返す、その形や性質を変えて浸潤や転移を行うため、通常細胞とは性質が異なり、これもまた特徴的な細胞であると言える。一見、生殖細胞とがん細胞は全く異なるものに思えるが、ヒトにおいて、生殖細胞とがん細胞でのみ共通して高発現が認められる遺伝子群が同定され、これらはがん精巣抗原遺伝子(cancer/testis antigen gene; CTA gene)と呼ばれている。これまでに発見されたCTA 遺伝子の中には *Sycp1*, *Syce2*, *Piwil2*, *Mael* など精子形成に重要とされている遺伝子や、*MAGE* や *SSX* などの上皮間葉移行および腫瘍形成、浸潤および転移を増大させる遺伝子が含まれている。しかし、CTA 遺伝子の中で生殖細胞とがん細胞の両者における機能が報告、議論されている遺伝子はごく少数であり、それらの遺伝子について双方の細胞における共通性や差異について検討された報告はない。そこで、本研究では、生殖細胞での解析が可能である、マウスを用いてCTA 遺伝子の機能解析と発現制御機構解析を試みた。特定のCTA 遺伝子に着目し、生殖細胞とがん細胞の双方からのアプローチにより解析を行い、各細胞での機能や発現制御機構を明らかにすることを目的とした。

修士学位論文(2016)において、CTA 遺伝子の一つである *Fthl17* (*Ferritin, heavy polypeptide-like 17*) のがん細胞での発現制御機構について述べ、*Fthl17* の発現が見られるがん細胞において、正常組織に比べて、*Fthl17* の5'側上流領域が低メチル化状態であり、この領域が発現制御に関わっていることを示した。同様に生殖細胞における発現制御機構も明らかにするため、精原幹細胞の培養細胞株であるGS細胞(Germline stem cells)を用いて解析を行った。*Fthl17* はがん細胞よりもGS細胞で著しく高い発現が見られた。GS細胞では*Fthl17* の転写開始点直前が、がん細胞ではその領域よりも上流の領域が、それぞれ低メチル化となっており、これらが発現誘導に関与していると示唆された。よって、双方の細胞でDNA低メチル化となっている領域がやや異なり、制御領域の使い分けによって、その発現量を制御していると推測された。これらより、がん細胞と生殖細胞での発現制御について、DNAメチル化レベルが*Fthl17* の発現レベルの制御に重要であるという点で共通していることが示唆された。

マウスCTA 遺伝子の生殖細胞とがん細胞における機能を明らかにし、その共通性や差異を理解するという目的を達成するため、がん細胞株で解析を行う対象遺伝子を絞り込むことを試みた。siRNAによる遺伝子ノックダウン(KD)を利用した細胞増殖・生存スクリーニングをがん細胞株で実施したところ、CTA 遺伝子には、KDで細胞数が低下する遺伝子、増加する遺伝子の両方が含まれていることが示された。また、その中から、2種類の細胞株で再現性よく、KDによって細胞数の著しい減少が見られた*Tekt5* 遺伝子を、がん細胞と生殖細胞での作用機構解析の対象とした。

Tekt5 は、大腸がんを使ったCTA 遺伝子の探索から同定され、様々ながんでの発現が確認されたが、その機能は明らかでない。一方、TEKT5は精子の鞭毛のミトコンドリア鞘に局在が見られ

るが、その詳細な機能は明らかでない。そこで、*Tekt5* に関してがん細胞と精巣での機能解析を行い、その機能と分子メカニズムを比較することで、生殖細胞とがん細胞での共通性や差異を検討した。

がん細胞においては、*Tekt5* KD によって、細胞周期調節因子である p27 の発現上昇による G1 期への蓄積、アポトーシスの亢進が見られた。さらに、*Tekt5* KD 細胞ではチューブリンの断片化が確認され、チューブリンを脱アセチル化する酵素である HDAC6 の発現上昇、チューブリンの安定化に関わるアセチル化チューブリンの低下が見られた。これらより、TEKT5 は HDAC6 の発現抑制を通じてチューブリンの安定化に寄与していると考えられた。また、*Tekt5* KD によって、TGF β シグナルの伝達を担い、微小管の脱重合で活性化される Smad3 の核移行が確認された。Smad3 は p27 の転写を誘導するため、*Tekt5* KD 細胞では Smad3 の核移行によって p27 の発現上昇が起これ、G1 期への蓄積が引き起こされる可能性が考えられた。精巣においては、精細管に siRNA をインジェクションする *in vivo* knockdown の系を利用し、*Tekt5* の生殖細胞における機能の解明を試みた。*Tekt5* KD 精巣では、異常精細管の増加と spermatid 分化の抑制の傾向が確認された。これより、*Tekt5* は spermatid 分化に必要な遺伝子であることが示唆された。また、*Tekt5* は生殖細胞分化に伴い発現上昇、*Hdac6* は生殖細胞分化に伴い発現低下が見られた。精子形成過程でのマンシェット形成にはアセチル化チューブリンが必要であると言われている。生殖細胞分化に伴う発現変化と、がん細胞での作用機構からの類推により、*Tekt5* KD では HDAC6 の発現上昇によるアセチル化チューブリンの低下が起これ、精子形成が阻害されている可能性が考えられた。これらより、がん細胞と生殖細胞に共通して、*Tekt5* は HDAC6 の発現抑制を通じてチューブリンの安定化に機能していることが予想され、そのチューブリンの安定化は、がん細胞では細胞周期、生殖細胞では精子の形態形成という、異なった場面に関与していると考えられた。本研究では、CTA 遺伝子の一つである *Fihl17* の発現制御を示し、生殖細胞とがん細胞の双方で共通した発現制御機構が働いていることを示した。また、*Tekt5* の機能を示し、生殖細胞とがん細胞の双方でその作用機構に接点が見られたことで、CTA 遺伝子の中には生殖細胞とがん細胞で類似した発現制御や機能を示す遺伝子が存在することが明らかになった。これらの知見はがん細胞と生殖細胞での CTA 遺伝子の発現の生理的意義やメカニズムを明らかにするための一助となりうる。

論文審査結果の要旨

本研究は、がん細胞と精巣で特異的に発現している、がん・精巣抗原(Cancer-Testis Antigen; CTA)遺伝子の、がん細胞と精巣生殖細胞での発現制御と機能の相違を比較解析することを目的とした。その結果から、両細胞の共通性や違いを明らかにするとともに、一つの CTA 遺伝子が、がん細胞と生殖細胞で機能する分子機構の解明を目指した。

まず、CTA 遺伝子の一つである *Fthl17* のがん細胞と生殖細胞での発現に、転写開始点上流領域の DNA 脱メチル化が共通して重要である一方、がん細胞では見られない、転写開始点直近の脱メチル化が、生殖細胞での高い転写活性化に寄与していることを示した。

また生殖細胞の増殖・生存に働いている CTA 遺伝子を選択するために、82 種類の CTA 遺伝子について、がん細胞でのノックダウン(KD)を行い、細胞数の増加に影響が見られる遺伝子のスクリーニングを行った。そして得られた機能未知の候補遺伝子 *Tekt5* について、がん細胞では細胞周期の G1 期の進行を促進し細胞死を回避する役割があることを明らかにした。また *Tekt5* は、ヒストン脱アセチル化酵素遺伝子 *Hdac6* の発現を抑制し、HDAC6 が誘導するチューブリンの脱アセチル化による脱重合と、その結果起こる SMAD3 の核移行を介したサイクリン依存キナーゼ阻害タンパク質 p27 の発現誘導による細胞周期阻害を抑制する働きがあることを見いだした。一方、精巣生殖細胞での機能を *in vivo* KD により調べ、半数体の精細胞が精子に分化する段階に必要であることを明らかにした。また精子形成過程では *Hdac6* の発現が低下することから、チューブリン重合による精子形態形成に関与する可能性が示唆された。これらの結果から、*Tekt5* が、がん細胞と生殖細胞で *Hdac6* の発現抑制によるチューブリンの安定化を介して、異なる役割を果たしていることが示唆された。

これらの研究結果から、がん細胞と精巣生殖細胞の発現制御と機能に関して共通性を持つ CTA 遺伝子の存在を示すことに成功した。これらのことから、青木七菜は自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、青木七菜提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。